

## 【総説】

## 第四回 高安賞最優秀賞受賞論文

論文 「Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia」

Blood

Vol.107, No.4, Page 1308-1314 2006年2月掲載

微小PNH型血球は再生不良性貧血患者の免疫抑制療法に対する高反応性と良好な予後を予想する因子である

杉盛 千春 (すぎもりちはる)

はじめに

再生不良性貧血 (AA) は骨髓低形成・汎血球減少を特徴とする症候群である。AAの多くは造血幹細胞に対する自己免疫反応によって発症すると考えられている<sup>1)</sup>が、その病態や症候群全体に占める自己免疫病態の割合は不明である。現在、重症例に対する標準治療は抗ヒト胸腺グロブリン (ATG) とシクロスポリン (CsA) による免疫抑制療法 (IST) であるが、ISTは約70%に奏効する一方、残りの30%には奏効しないばかりか、IST自体が易感染性を増悪させ予後を悪化させる可能性がある。AAの病態を解明することは患者予後をさらに向上させる上できわめて重要である。

われわれは、免疫病態のマーカーとして発作性夜間血色素尿

症 (PNH) 型血球の増加に着目した。PNH型血球は、X染色体上のphosphatidylinositolglycan-class A (PIG-A) 遺伝子の後天的変異によってglycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーが合成不能となり、その結果GPIアンカー型膜蛋白 (群) が欠損した血球である。これらの血球がPNH型血球と呼ばれるのは、GPIアンカー型膜蛋白の中のCD55, CD59が補体防御因子であるため、これらを欠損すると補体攻撃から自身を守れなくなり、PNH型赤血球の割合が赤血球全体の5~10%以上になると臨床的PNHとなるからである。このPNH型血球がAAの一部 (10~30%) で増加していることは以前から知られていた。その機序として、造血幹細胞膜上の何らかのGPIアンカー型膜蛋白が、造血幹細胞が免疫学的攻撃を受ける上で重要な役割を果たしてい

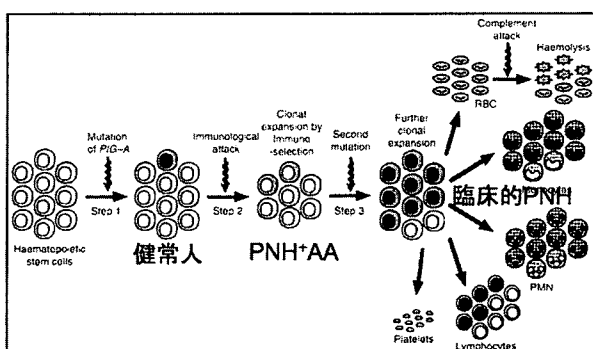


図1. PNHクローン拡大機序の概念図 (T. Kinoshita, Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria and Related Disorders Molecular Aspects of Pathogenesis. 2003.より引用) 第一段階: PIG-A 遺伝子異常によるPNH型血球の出現, 第二段階: 造血幹細胞に対する免疫学的攻撃からの逃避による生存優位性の獲得 (PNH型血球の微小増加), 第三段階: PNH型造血幹細胞あるいは健常型造血幹細胞に付加的な異常が加わることによるPNH型血球のさらなる増加

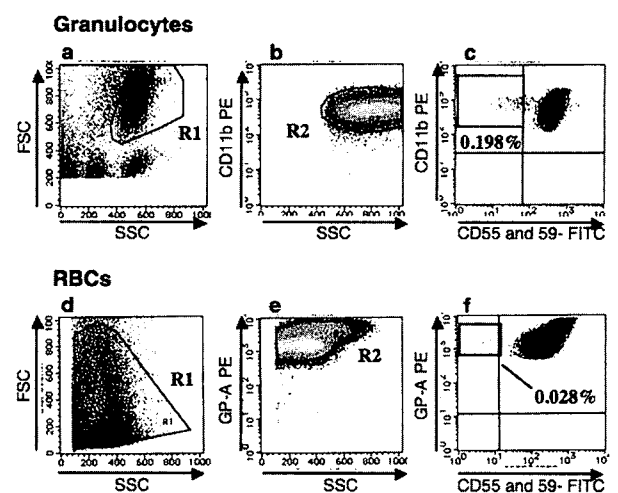


図2. 高感度2-colorフローサイトメトリ法によるPNH型血球の検出

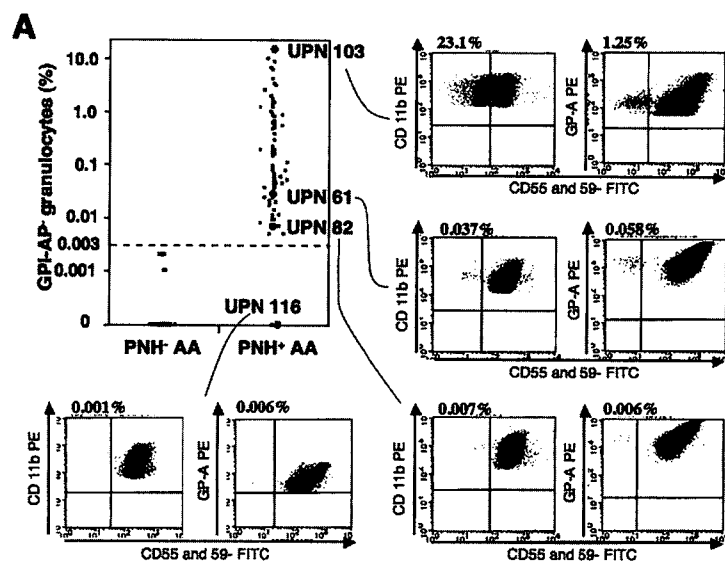


図3. PNH型顆粒球の割合 (Blood 107: 1308-1314, 2006 より改変)

UPN103 ; PNH型顆粒球は多いがPNH型赤血球は少ない1例 (だから臨床的PNHと診断されない), UPN63 ; 典型的なPNH+AAの1例, UPN82 ; 一方で微少にPNH型血球が増加したPNH+AAの1例, UPN116 ; PNH型赤血球のみが増加したPNH+AAの1例

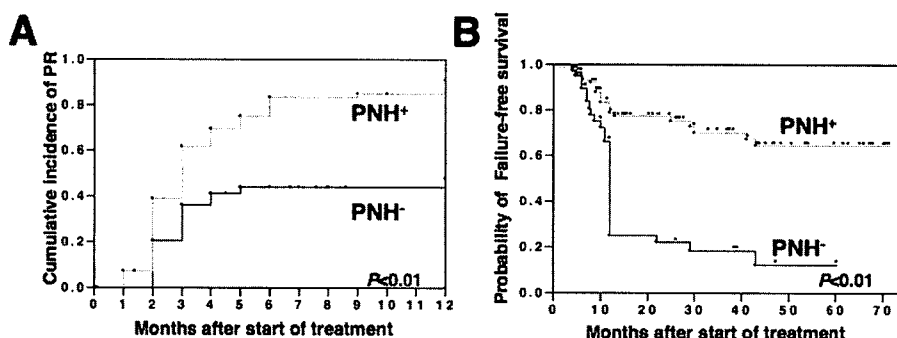


図4. ISTに対する反応性 (Blood 107: 1308-1314, 2006 より改変) (A) 累積治療奏効率 (B) 治療奏効維持生存率

るため、それを欠損しているPNH型造血幹細胞は攻撃から逃れて生き残りやすいという「エスケープ現象」が指摘された<sup>2)</sup>。

われわれは、PNH型血球の増加が造血幹細胞に対する免疫学的攻撃によるものならば、それこそが免疫病態のマーカーとなり得るのではと予想した。これまでの報告では、PNH型血球を検出するフローサイトメトリの感度が低く、多数例を解析したものはなかった。そこでごく少数のPNH型血球を検出できる高感度フローサイトメトリを開発し、多数のAA患者を対象として、①PNH型血球が増加したAA (PNH+AA) 例の割合、②PNH型血球の増加とIST奏効率との関係、③IST前後でのPNH型血球の変化、④PNH+AAにおけるPNH型血球の長期間の推移の観察の4点を検討した。

*PIG-A* 遺伝子異常を持つ血球は健常者でもごく少数存在することが明らかになっている<sup>3)</sup>。さらに、*PIG-A* マウス相同遺伝

子 *Pig-a* を破壊したPNHモデルマウスでは、長期間観察してもPNHクローンの拡大は起こらない<sup>4)</sup>。つまり、*PIG-A* 遺伝子異常だけでは臨床的PNHは発症しない。PNHクローンが拡大するメカニズムは、現在は図1のように考えられている<sup>5)</sup>が、第三段階は全くの仮説であり、PNH+AAから臨床的PNHへの移行率もはっきりしない。本研究の成果は、PNHクローン拡大メカニズム解明の手がかりにもなると考えた。

#### 方法

1999年4月から2004年12月までに診断され、診断後1年以内にATG+CsA療法を施行されたAA患者のうち、治療前にPNH型血球増加の有無を確認できた122例を対象とした。PNH型血球検査には、高感度2-colorフローサイトメトリによるPNH型血球検査法 (高感度法、図2) を用いた。本法では、CD11b

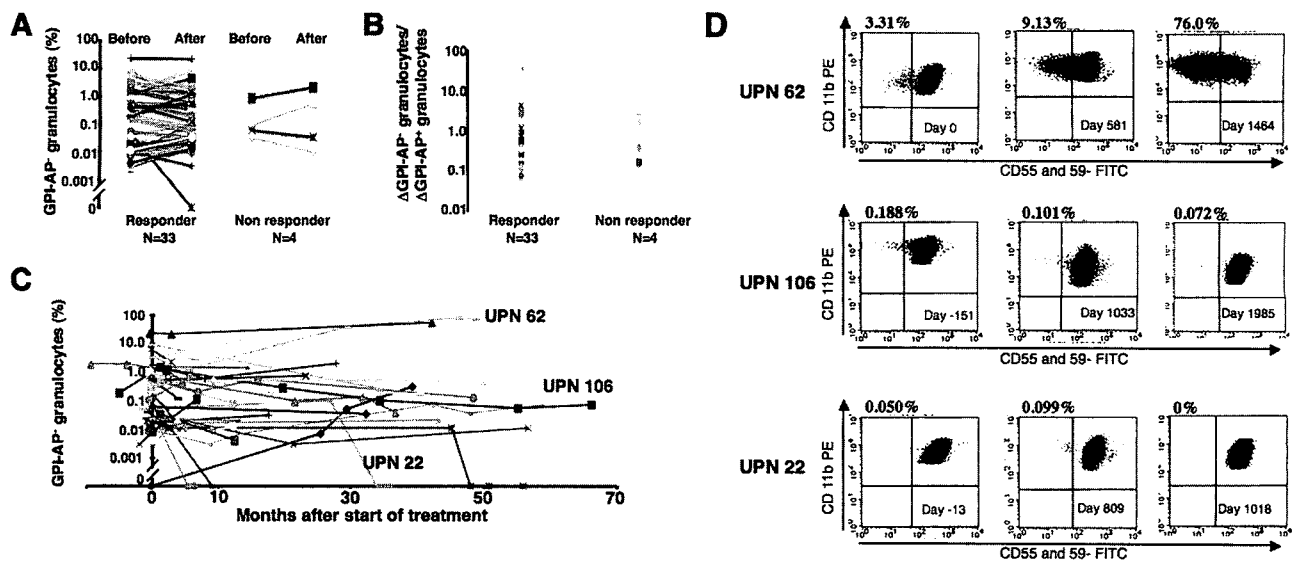


図5. PNH型顆粒球の推移 (Blood 107: 1308-1314, 2006より改変)

(A) IST前後での割合変化 (B) (PNH型血球のIST前後での変化率, a) / (健康型血球のIST前後での変化率, b) (C) PNH型血球の長期的推移 (D) UPN62; 臨床的PNHに進展した1例, UPN106; 5年間ほとんど割合変化のない1例, UPN22; PNH型血球が検出されなくなった1例

(PE)を高発現している顆粒球およびglycophorin-A (PE)を高発現している赤血球のみを解析対象とすること, 抗CD55 FITC抗体と抗CD59 FITC抗体をミックスすること, 以上の抗体の組み合わせからPNH型血球がupper left領域に出現するようにし,  $y = x$ の線上付近に出現する抗体が非特異的結合したdotを算出しないようにすることによって, PNH型血球の検出精度を上げることができた。本法では健康人68例の解析結果からPNH型顆粒球は0.003%, PNH型赤血球は0.005%以上を有意な増加と判定し, PNH型血球の増加は, 両系統が陽性, もしくは2回以上連続して片系統のみ陽性であることと定義した。予備研究の後に行った健康人200例の解析でも有意な増加を示す例は皆無であった。

## 結果

### 1. PNH\*AAの割合と臨床的特徴

PNH\*AAは全体の68% (83/122)であった。約80%の患者でPNH型血球の増加は1%未満の微小なレベルにとどまっていた (図3)。PNH\*AAはPNHAAと比べて大球性貧血を示し, 血小板減少の程度が強い傾向がみられた。

### 2. ATG+CsA療法に対する反応性とPNH型血球増加との関係

PNH\*AA群におけるISTの奏効率 (1年での部分及び完全寛解率, 91%)は, PNH型血球の増加が見られなかったAA例 (PNH\*AA, 48%)に比べて有意に高かった ( $P < 0.01$ , 図4A)。5年完全寛解率でもPNH\*AA群 (36%)はPNHAA群 (3%)より有意に高かった ( $P = 0.03$ )。PNH型血球増加の程度と治療反応性との間には有意な相関は見られなかった。

### 3. IST後のAAの予後とPNH型血球増加の関係

5年全生存率は両群間で差がなかった (77% vs 71%) が, 無

効・再発・骨髓異形成症候群 (MDS), 急性骨髄性白血病 (AML), 臨床的PNHなどへの移行・死亡をfailureと定義した5年failure-free survivalはPNH\*AA群で明らかに高値であった (64% vs 12%,  $P < 0.01$ , 図4B)。臨床的PNH・MDS・AML発症率は両群間で差がなかった (9% vs 7%)。再発率はPNH\*AA群で低い傾向にあった (21% vs 36%,  $P = 0.08$ )。

### 4. IST前後およびIST後長期経過例におけるPNH型血球数と割合の変化

IST後に追跡できた53例 (PNH\*AA 37例, PNHAA 16例)で治療前後でのPNH型血球量・割合の変化を検討した結果, PNH\*AA37例のうち治療が奏効した33例, 無効であった4例ともに有意な変化を示さなかった (図5A,B)。PNHAA 16例のうち治療後1例のみPNH\*となったが, その症例はその後再発した。2年以上経過を追跡できた23例でPNH型血球量・割合の推移を観察したところ, ほとんどの症例ではほぼ一定であった (図6C,D)。

## まとめ

新規発症のAA患者の68%でPNH型血球が増加していた。経過中に新たにPNH型血球が検出される例はほとんどなく, 微少増加はAA発症と密接に関係した現象であることが示唆された。PNH型血球の増加は, AA患者のISTに対する高反応性を予測する因子であることが示された。さらに, 全生存率には差がないものの, PNH\*AA例では長期にわたって良好な予後が得られることも明らかになった。

PNH型血球はIST前後でほとんど変化が見られなかった。PNH\*AA患者のPNH型血球は, 診断時から治療後の長期間安定して存在することから, 造血幹細胞に対する免疫学的攻撃は

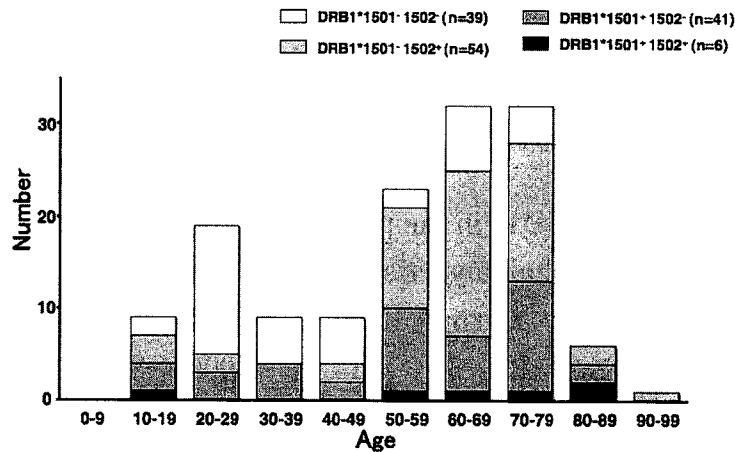


図6. 再生不良性貧血患者の年齢層別 HLA-DR15保有率 (Exp Hematol, in press)

PNH型幹細胞に対しても起こっており、PNH型幹細胞自身には正常幹細胞と比べて明らかな増殖の優位性はないことが示唆された。

PNH\*AAから臨床的PNHへの進展は数年の観察期間ではほとんど見られなかった。さらに長期間の観察が必要ではあるが、PNH型血球割合の推移から見て、臨床的PNHに移行する頻度はこれまでの報告よりも低いと予想される。もし、ある時点で急激にPNHクローンの拡大が見られた場合には、そのPNHクローンに付加的な遺伝子異常が加わっている可能性が高い。PNH\*AA例におけるPNH型血球数の推移を定期的に観察することはPNHクローン拡大のメカニズムを明らかにする上で有用と思われた。

おわりに

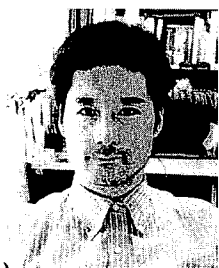
造血幹細胞に対する免疫学的攻撃が起こっているAAでは、発症のごく初期にPNH型血球の微少増加が起こるのにもかかわらず、免疫学的攻撃自体はPNH型血球にも同等に起こるといのは、作業仮説と異なる意外な所見であった。PNH型血球がなぜ増加するのかを解明するためには、やはり「自己免疫AAの自己抗原はなにか？」という究極の命題を解き明かさなくてはならない。われわれは、50歳以上のAA患者では、HLA-DR抗原としてDR15を保有している頻度が80%にも及ぶことを明らかにした(図6)。このDR抗原の顕著な保有率からHLA-DR15に拘束性の自己抗原が免疫学的機序を惹起していることが強く示唆された。

謝 辞

いつもあたたくご指導下さる中尾眞二教授、いろいろと助けてくれる家族、仕事を手伝ってくれるラボの吉井愛さん・大海理恵さん、事務の後藤佳代さんに心からの感謝の念をここに表します。

文 献

- 1) Young NS. Acquired aplastic anemia. Ann Intern Med. 2002;136: 534-546.
- 2) Murakami Y, Kosaka H, Maeda Y, Nishimura J, Inoue N, Ohishi K, Okabe M, Takeda J, Kinoshita T. Inefficient response of T lymphocytes to glycosylphosphatidylinositol anchor-negative cells: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 2002; 100:4116-4122.
- 3) Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. Blood. 2005; 105: 3848-3854.
- 4) Rosti V, Tremml G, Soares V, Pandolfi PP, Luzzatto L, Bessler M. Murine embryonic stem cells without pig-a gene activity are competent for hematopoiesis with the PNH phenotype but not for clonal expansion. J Clin Invest. 1997; 100: 1028-1036.
- 5) Kinoshita T, Inoue N. Relationship between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Int J Hematol. 2002; 75:117-122.



## Profile

所 属：金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学（旧第三内科）  
 1999年 金沢大学医学部卒業  
 2006年 金沢大学大学院医学系研究科（内科学専攻・細胞移植学）修了  
 趣 味：旅行、散歩